

554109

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 11 月 4 日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/093910 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/192, 31/426,  
A61P 25/28, 25/16, 9/10, 21/00, 25/00

目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 松岡 信也 (MATSUOKA, Nobuya) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005429

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 15 日 (15.04.2004)

(74) 代理人: 田伏 英治 (TABUSHI, Eiji); 〒532-8514 大阪府 大阪市 淀川区加島 2 丁目 1 番 6 号 藤沢薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-117381 2003 年 4 月 22 日 (22.04.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NL, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 喜多 康浩 (KITA, Yasuhiro) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 山崎 高生 (YAMAZAKI, Takao) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 村元 正和 (MURAMOTO, Masakazu) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 岩下 明令 (IWASHITA, Akinori) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 森口 聡 (MORIGUCHI, Akira) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 2004/093910 A1

(54) Title: REMEDY FOR CEREBRAL NEURODEGENERATIVE DISEASES USING PPAR  $\delta$  AGONIST

(54) 発明の名称: PPAR  $\delta$  アゴニストによる脳神経変性疾患治療剤

(57) Abstract: A compound having a protective effect on nerve cells can be re-selected by adding a PPAR  $\delta$  agonist to a cell culture system treated with toxins such as thapsigargin, MPP<sup>+</sup> and staurosporine and re-selecting a compound capable of elevating the survival ratio. A compound selected by this method is usable as the active ingredient in a remedy for neurodegenerative diseases such as cerebral infarction and Parkinson's disease and, therefore, is highly useful in studies for developing new drugs.

(57) 要約: 本発明によれば、PPAR  $\delta$  アゴニストを thapsigargin, MPP<sup>+</sup>, staurosporine 等の毒素を作用させた培養細胞系に添加して生存率を向上させる化合物を再選択することにより、神経細胞に対して保護作用を有する化合物を再選択することが可能である。このような方法で選択された化合物は、脳梗塞やパーキンソン病などの神経変性疾患治療剤の有効成分として用いることができ、新薬創出の為の研究に極めて有用である。

## 明細書

PPAR $\delta$  アゴニストによる脳神経変性疾患治療剤

## 5 技術分野

本発明は、PPAR $\delta$  にアゴニスト作用を示す化合物の脳神経変性疾患治療剤の用途に関する。また本発明は、当該化合物を有効成分として含む薬剤を投与することによる脳神経変性疾患の治療方法に関する。

## 10 背景技術

脳梗塞、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病等の様々な中枢性疾患では、いずれも神経細胞の変性が原因となり、様々な重篤な障害が生じている。

例えば、周知のように、脳の血管が詰まって血液が流れなくなったり(脳梗塞)、脳の血管が裂けて出血したり(脳出血)して、脳の組織が傷害されることにより、脳の神経細胞が生きていくために必要な量の血流が確保されないと、脳は極めて短時間で壊死に陥いる。これらの虚血に伴う神経細胞死は、直接的に虚血状態にさらされる梗塞巣のコア領域の神経細胞の壊死に始まり、次第に周辺領域(penumbra)に波及して多くの神経細胞に障害を拡大させる。このうちコア領域の壊死は、極めて短期間に不可逆的に生じる為、今日、実質的な治療は不可能と考えられている。しかしながら、周辺領域の神経細胞死は、隣接する神経細胞の壊死による影響を受けながら緩慢に進行する為、初期段階においてはある程度可逆的に抑制可能なものではないかと推測されており、その期待のもとに、様々な治療薬開発の試みがなされて来ている。しかしながら、現在のところ、これら虚血状態における神経細胞変性の分子的メカニズムは十分には解明されておらず、臨床現場ではっきり神経細胞死抑制の治療効果が証明された薬剤は未だ見出されていない。

一方、パーキンソン病(Parkinson's disease, PD)は、黒質線条体系ドーパミン作動性ニューロン(nigrostriatal dopaminergic neurons)が、長期間に渡って次第に変性することにより、振せんや筋肉の硬直、運動不能などの症状を生じる中枢性疾患である。人口あたりの発症頻度がかなり高い疾患であるが、発病に至る詳しい原因については未だ解

明されていない。遺伝的ファクター、内因性及び外因性の毒素、酸化ストレス(oxidative stress)等が微妙に影響して病状の悪化をもたらしているのではないかと推測されている。この疾患においては、数多くの神経細胞の中で黒質線条体系ドーパミン作動性ニューロンだけが選択的に変性されるが、その神経変性を有意に抑制してパーキンソン病の進行そのものを実質的に抑止できることが臨床的に明確に確認された薬剤は今のところ存在しない。

従って、これらの脳梗塞やパーキンソン病等の重篤な疾患を根本的に治療する為には、神経変性を抑制する薬剤や損傷を受けた神経の再生を促す薬剤の開発が切望されている。臨床的に有効な薬剤を見出す為の第1歩として、神経変性過程に関与の疑われる様々な標的蛋白質分子を用いたスクリーニングによって、例えば神経系培養細胞における神経細胞死を抑制するような化合物を見出し、上記の中枢性疾患を模擬したマウスやラットなどの動物モデルにおいて、それら化合物の効果を確認する手法が一般的に行なわれている。新しい標的蛋白質の発見は、新しい治療薬発見の為の重要な一歩と考えられている。現在までに、主として脳梗塞状態を模擬した実験モデル動物を用いた解析から、神経変性過程に関与することが疑われる数多くの遺伝子産物が見出されてきている。

ところで、脂肪分解に関与する細胞内小器官ペルオキシソームを増加させる作用を仲介する蛋白質として見出されたペルオキシソーム増殖薬応答性受容体 (peroxisome proliferator-activated receptors: PPAR) は、グルココルチコイド、エストロゲン、プロゲステロン、甲状腺ホルモン、及び脂溶性ビタミンなどをリガンドとする転写因子、核内受容体スーパーファミリーの一員である。これまでの数多くの研究から、PPAR は、多くの遺伝子発現を制御する上で極めて重要な機能を担っており、数多くの疾患に関連することが知られているので、神経細胞死との関連も注目される。

これまでに、ヒト PPAR には、少なくとも $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の3種のサブタイプが存在することが判明している。PPAR の各サブタイプは、9-cis レチノイン酸をリガンドとする RXR とヘテロ二量体を形成し、プロモーター領域に PPAR 応答領域 (PPAR responsible element: PPRE: 5'-AGGTCA-X-AGGTCA-3') を有する種々の遺伝子の発現制御をつかさどっている。一般に、PPAR/RXR ヘテロダイマーにリガンドが結合する際には、co-repressor の解離と co-activator との会合が起こり、転写活性化能を発揮すると考えられている。

PPAR $\alpha$ は、肝臓、腎臓、心臓、消化管など脂肪酸利用度の高い組織において高発現しており、脂肪酸の代謝、特に脂肪酸の酸化を調節する役割を担っている。また、PPAR $\alpha$ ノックアウトマウスの研究などによって、PPAR $\alpha$ が、高脂肪食下におけるインスリン抵抗性発症に密接に関与していることも推察されている。

- 5 PPAR $\gamma$ は、脂肪細胞分化に重要な役割を担っていることが知られている。例えば、繊維芽細胞に PPAR $\gamma$ を発現させ、PPAR $\gamma$ の強力な合成リガンドであるチアゾリジン誘導体(thiazolidinedione: TZD)を処理すると脂肪細胞に分化することが知られている。さらに、チアゾリジン誘導体は、肥満を伴う2型糖尿病のインスリン抵抗性改善薬である。PPAR $\gamma$ は、チアゾリジン誘導体投与などの比較的高濃度のリガンドにさらされた場合は、脂肪細胞の分化が誘導され、小型脂肪細胞の増加と肥大脂肪細胞のアポトーシスの結果、インスリン感受性亢進に作用する。しかし、チアゾリジン誘導体の存在しない状態で、高脂肪食負荷(HF)といった比較的低濃度のリガンドにさらされた場合は、脂肪細胞肥大、脂肪蓄積とインスリン抵抗性に作用すると考えられている。
- 10

- 一方、PPAR $\delta$ は、脳、肝臓、腎臓、脾臓、脂肪、骨格筋、消化管、皮膚、胎盤など広範な組織に発現しており、脂肪細胞分化、脳機能、表皮分化などにおける機能が報告されている。PPAR $\delta$ のノックアウトマウスは、約90%が胎生致死で、出生しても野生型と比較し、胎生期及び出産後を通じて発育不良が見られる。また脳が体の大きさに比例して小さく、脳梁のミエリン形成において異常が認められる。また表皮の過形成がノックアウトマウスにおいて有意に増強される。このように、PPAR $\delta$ は、発生、脂質代謝、脳のミエリン形成、表皮細胞増殖に密接に関与していることが示唆されている。また、PPAR $\delta$ 選択的アゴニストにより、コレステロール逆転送系の活性化、リポ蛋白組成比の改善、中性脂肪の低下が見られるという報告がある。PPAR $\delta$ は脳に豊富に発現しているサブタイプであるが、その脳内における生理的役割についてはまだ殆ど解明されていない。
- 15
- 20

- これらのPPARの各サブタイプの役割と神経変性疾患との関係については、まだ十分に解明されているわけではない。しかしながら、これまでに、比較的解析の進んでいるPPAR $\gamma$ において、PPAR $\gamma$ にアゴニスト活性を示す化合物が、脳梗塞やパーキンソン病の動物モデルにおいてある程度の治療効果を示すことを示唆する報告がなされている。例えば、S. Sundararajan 等は、PPAR $\gamma$  agonist が、ラット脳梗塞モデルで有効であることを報告している(S. Sundararajan, W.D. Lust, D. M. D. Landis and G.E.
- 25

Landreth Soc. Neurosci. Abstr. 26 (2000), p1808. PPAR gamma agonists reduce ischemic injury and immunoreactivity against inflammatory markers in rats.)。

また、S. Uryu 等は、Troglitazone が cerebellar granule neurons の細胞死を抑制することを報告しており、神経細胞死の抑制剤としての用途が類推されているが、PPAR  $\gamma$  agonist が一般的に神経細胞死の抑制に関係するかどうかについては、必ずしも明確ではない。(Shigeko Uryu, Jun Harada, Marie Hisamoto and Tomiichiro Oda. Brain Research 924 (2002) p229-236. Troglitazone inhibits both post-glutamate neurotoxicity and low-potassium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons)。

また、T. Breidert 等は、PPAR  $\gamma$  agonist の一種 pioglitazone が、マウスの MPTP 誘発パーキンソン病モデルにおける神経変性に対して保護的に働くことを報告している(T. Breidert, J. Callebert, M. T. Heneka, G. Landreth, J. M. Launay and E. C. Hirsch. Journal of Neurochemistry 82 (2002) p615-624. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease)。これは PPAR  $\gamma$  アゴニストの抗炎症効果によるものと考えられる。

WO0249626A2 は、PPAR  $\gamma$  agonist の、脳梗塞、パーキンソン病 など神経変性疾患に対する治療方法を開示している。

また、WO0213812A1 は、PPAR  $\gamma$  アゴニストによる神経変性疾患(neurodegenerative disease)、炎症性疾患などの治療法を開示している。その際、神経変性疾患としては、脳梗塞、パーキンソン病、アルツハイマー病などを特定しており、また PPAR  $\gamma$  / PPAR  $\delta$  dual agonist についても同様の治療効果のあることを開示している。しかしながら、当該明細書においては、PPAR  $\delta$  アゴニスト単独の効果については、何ら言及されていない。これは、サブタイプ選択性の低い PPAR  $\gamma$  アゴニストにおける効果を PPAR  $\gamma$  / PPAR  $\delta$  dual agonist による効果であると表現したもので、PPAR  $\delta$  アゴニストによる作用が、PPAR  $\gamma$  アゴニストによる作用と区別されて明確に確認されている訳ではない。

ところで、代表的な PPAR  $\gamma$  アゴニストである rosiglitazone, pioglitazone などの Thiazolidinediones 系の化合物では、いくつかの重篤な副作用の可能性が示唆されている。中でも、これらの薬剤の2型糖尿病治療薬としての臨床試験や各種の動物実験を通じて、水分貯留の副作用が見出されている(Sood V, Collieran K, Burge MR. Diabetes Technol Ther 2 (2000) p429-440. Thiazolidinediones: a comparative review of approved

uses.)。水分貯留の増大は、しばしば脳浮腫につながり、脳梗塞に対し増悪的に作用する懸念がある。その為、これらの PPAR $\gamma$  アゴニストを脳梗塞治療薬として開発することには、本質的な困難が伴うことが予想される。

他方、現在までのところ、PPAR $\delta$  が、脳梗塞、パーキンソン病など神経変性疾患の  
5 発症と直接に関連することを示した報告はない。また浮腫との関連を示す報告も知られていない。しかしながら、PPAR $\delta$  が、アポトーシスや炎症性の細胞死に関係することを示唆する報告が若干存在する。

例えば、T. Hatae 等は、ヒト胎児腎臓由来の293細胞に prostacyclin synthase 遺伝子発現ベクターを導入、PPAR $\delta$  を活性化させるとアポトーシス(apoptosis)が生じること  
10 を報告している (Toshihisa Hatae, Masayuki Wada, Chieko Yokoyama, Manabu Shimonishi, and Tadashi Tanabe. Prostacyclin-dependent Apoptosis Mediated by PPAR $\delta$ . The Journal of Biological Chemistry 276 (2001) pp.46260-46267.)。

さらに、WO0107066A1 には、PPAR $\delta$  の阻害剤を投与することにより、マクロファージ (macrophage) から泡沫細胞(foam cells)が形成する過程を阻害することができ、様々  
15 な血管疾患(vascular disease)を治療可能であることが述べられている。治療可能な血管疾患として脳梗塞(stroke)やアルツハイマー病が例示されている。しかしながら、当該明細書では、マクロファージで発現する PPAR $\delta$  が、炎症反応を引き起こす為にこれら疾患の増悪因子となることが捉えられているにすぎない。逆に、中枢神経系細胞において発現している PPAR $\delta$  の役割や、PPAR $\delta$  アゴニストの治療薬としての可能性につ  
20 いては、全く言及されていない。

#### 発明の開示

これまでの研究から、PPAR $\gamma$  にアゴニスト活性を示す一部の化合物には、脳梗塞等における神経変性の進行を抑制する作用があることが示唆されている。しかしながら、  
25 PPAR $\gamma$  にアゴニスト活性を示す個々の化合物については、同時に PPAR $\alpha$  や PPAR $\delta$  に対するアゴニスト活性も若干ながら有している場合が多いため、PPAR 各サブタイプに対するアゴニスト活性と神経変性疾患に対する治療効果との関連は、まだ十分には解明されていない。PPAR $\gamma$  については、そのアゴニスト自体がニューロンの細胞死を直接抑制しているという報告はなく、むしろ PPAR $\gamma$  アゴニスト本来のもつ抗炎症作用を通じ

て間接的に神経細胞死抑制効果がもたらされている可能性が高い。このことは、PPAR  $\gamma$  アゴニストの治療効果が、炎症を伴う神経変性疾患の炎症期の治療にのみ限定されることを示唆している。また、これまでに PPAR  $\gamma$  アゴニストの多くは、重篤な水分貯留等の副作用を生じることが知られており、脳神経系の治療に際には、脳浮腫を増悪させる可能性も考えられる為、臨床への応用を困難にしている。従って、PPAR アゴニスト作用を有する化合物の中から、直接的にニューロンの細胞死を抑制でき、広く様々な神経変性疾患の治療に有効で水分貯留等の副作用を示さない化合物を選択し、臨床現場への応用を可能とする為の優れた方法を提供することが強く求められている。本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。本発明者等の今回の研究から、PPAR  $\delta$  に特異的なアゴニストが、単独で脳梗塞やパーキンソン病等の神経変性疾患に有効であることが初めて明らかにされた。さらに、PPAR  $\delta$  アゴニストが直接ニューロン細胞に作用して細胞死を抑制することも明らかとなった。これらの結果から、PPAR  $\delta$  アゴニストは PPAR  $\gamma$  アゴニストに比べて、より広範な神経変性疾患の治療に有効と考えられる。

本発明者らは、神経系由来の培養細胞系を鋭意工夫し、様々な神経毒による作用と神経細胞死との関連を研究するなかで、PPAR  $\delta$  アゴニストが、thapsigargin, MPP+, staurosporine 等による神経細胞死を有意に抑制する事実を初めて見出した。そこで、これらの PPAR  $\delta$  アゴニストを用いて、脳梗塞モデル動物での有効性を評価したところ、実際に、これらの PPAR  $\delta$  アゴニストには、脳梗塞に伴う虚血状態での神経細胞死に対する抑制作用があることを確認した。また、MPTP 誘発パーキンソン病モデル動物においても、MPTP による脳内ドーパミン含量の低下を回復させることを確認した。そして、PPAR  $\delta$  にアゴニスト活性を有する化合物が、脳梗塞やパーキンソン病などの神経変性疾患の治療に有用であり、それらの化合物の中から有用な治療剤を選択しうることを見出した。

すなわち、本発明は、PPAR  $\delta$  アゴニストを有効成分として含む神経変性疾患治療剤を投与することによるアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療方法に関する。

また、本発明は、PPAR  $\delta$  アゴニストを有効成分として含むアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化

症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤に関する。

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

5

《1》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤。

10 《2》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによるアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療方法。

15 《3》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む脳梗塞の治療剤。

《4》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むパーキンソン病の治療剤。

20 《5》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによる脳梗塞の治療方法。

《6》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによるパーキンソン病の治療方法。

25 《7》 PPAR $\delta$  アゴニストが、細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである《1》, 《3》, 《4》に記載の治療剤。

《8》 PPAR $\delta$  アゴニストが、細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである《2》, 《5》, 《6》に記載の治療方法。



《9》 PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの《1》, 《3》, 《4》に記載の治療剤。

5 《10》 PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの《2》, 《5》, 《6》に記載の治療方法。

10 《11》 アルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

《12》 脳梗塞治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

15 《13》 パーキンソン病治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

《14》 PPAR $\delta$  アゴニストが細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである《11》-《13》記載の使用。

20 《15》 PPAR $\delta$  アゴニストが L-165041 または GW501516 である《11》-《13》記載の使用。

《16》 PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む中枢神経細胞死抑制剤。

25 《17》 PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの《16》に記載の中枢神経細胞死抑制剤。

以下に、本発明について詳細に説明する。

本発明は、PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハン

チントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤及び治療方法に関する。

上記発明の『PPAR $\delta$  アゴニスト』は、PPAR $\delta$  作動薬またはPPAR $\delta$  作用薬ともよばれ、核内受容体であるPPAR $\delta$  蛋白質に特異的に結合してその構造変化をもたらし、PPAR $\delta$ -RXR複合体のPPRE (peroxisome proliferator response element) への結合を促進し、PPRE配列をプロモーター領域に有する種々の遺伝子の発現を促すことにより種々の生理作用を示す低分子化合物をいう。

代表的な『PPAR $\delta$  アゴニスト』活性を示す公知の化合物としては、例えば、L-165041及びGW501516 をあげることができる。

L-165041 (4-[3-[2-propyl-3-hydroxy-4-acetyl]phenoxy]propyloxyphenoxy acetic acid)は、PPAR $\delta$  及びPPAR $\gamma$  の両方に結合活性を有するが、PPAR $\gamma$  に対するアフィニティ(Ki 730 nM)は、PPAR $\delta$  に対するアフィニティ(Ki 6 nM)よりはるかに弱いことが報告されている(Mark D. Leibowitz 等. Activation of PPAR $\delta$  alters lipid metabolism in db/db mice. FEBS Letters 473 (2000) 333-336.)。

GW501516 は、PPAR $\delta$  に強いアフィニティを示す化合物で(Ki=1.1 $\pm$ 0.1 nM)、GAL4-responsive reporter gene を用いてアゴニスト活性を測定すると高い発現誘導活性(EC<sub>50</sub>=1.2 $\pm$ 0.1 nM)を示し、その効果は、PPARの他のサブタイプに比べPPAR $\delta$  に対して1000倍以上の選択性が見られることが報告されている(William R. Oliver, Jr. 等. A selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  agonist promotes reverse cholesterol transport. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 5306-5311.)。

上記の文献情報は、本発明者等の予備的実験結果からも裏付けられている。すなわち、本発明者等は、L-165041及びGW501516のヒト及びマウス由来のPPAR各サブタイプに対する選択性について、GAL4-各PPARサブタイプの融合蛋白による転写活性化作用をGAL4-responsive reporter geneで評価し、両化合物がヒト及びマウスのPPAR $\delta$  に特に高い選択性を有することを確認した。またその際、GW501516の方がL-165041よりも高い選択性と発現誘導活性を示すことも確認した(参考例1, 表7参照)。

PPAR  $\delta$  のサブタイプに比較的高い特異性を示す既存のアゴニストとしては、L-165041 及び GW501516 の両化合物以外にも、既に WO2002100351, WO0200250048, WO0179197, WO0246154, WO0214291, 特願2001-354671 等に数多くの化合物が報告されている。また、Brown PJ 等 (Brown PJ, Smith-Oliver TA, Charifson PS, Tomkinson NC, Fivush AM, Sternbach DD, Wade LE, Orband-Miller L, Parks DJ, Blanchard SG, Kliewer SA, Lehmann JM and Willson TM., Chem. Biol. (1997), p909-918. Identification of peroxisome proliferator-activated receptor ligands from a biased chemical library) により、例えば GW2433 などの化合物が報告されている。

通常の実験技術を有する当業者であれば、これらの化合物の中から、後述の培養細胞を用いた選択方法により、神経保護作用を有する化合物を再選択することは、容易に実施可能と思われる。

『PPAR  $\delta$  アゴニストの選択方法』としては、例えば以下の方法があるが、これらは例示にすぎず、特にこれらの方法に限定されるものではない。通常の実験技術を有する当業者であれば、これらの方法に基づいて細部をさらに最適化した方法を容易に工夫し実施できる。

PPAR アゴニストを選択する為のレポータージーンアッセイ法は公知である。たとえば、酵母が有する Gal4 転写系及び Gal4-PPAR  $\delta$  融合蛋白質を利用したワンハイブリッドレポータージーンアッセイが報告されている。(Lehman JM, More LB, Smith Oliver TA, Wilkinson WO, Willson TM, & Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). J. Biol. Chem. 270 (1995) 12953-12956.) この方法において、PPAR  $\delta$  が酵母の転写系を駆動する作用が評価される。

また、PPAR アゴニストの選択は、以下の文献に示されるように、PPAR  $\delta$  の認識応答配列である PPRE と全長の PPAR  $\delta$  を利用するレポーターアッセイ系によって、生体内の転写システムを再現することによっても可能である。

(Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, & Wahli W. Control of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell

68 (1992) 879-887.)

(Kliever SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, & Evans RM. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 91 (1994) 7355-7359.)

(Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, & Wahli W. The PPAR  $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammation control. Nature 384 (1996) 39-43)

(Forman BM, Chen J, & Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\delta$ . Proc. Nat. Acad. Sci., USA 94 (1997) 4312-4317.)

(Basu Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, & Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta$  regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. J. Biol. Chem. 274 (1999) 35881-35888.)

(He TC, Chan TA, Vogelstein B, & Kinzler KW. PPAR  $\delta$  is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Cell 99 (1999) 353-345.)

レポーターアッセイ系を構成するにあたっては、通常、プロモーター領域に PPAR 応答領域 (PPAR responsible element: PPRE: 5'-AGGTCA-X-AGGTCA-3') を配列既知の構成的 (constitutive) に発現するプロモーターと連結させた転写制御領域を構築して、この転写制御領域の下流にレポーター遺伝子を人工的に連結させた DNA 構築物 (DNA construct) を連結させる。また、PPAR 遺伝子を既知遺伝子プロモーターと連結させた発現ベクターを構築する。それらの DNA 構築物を適当な培養細胞 (例えば CV-1 細胞) に導入し、種々の化合物を添加した際のレポーター遺伝子の発現量を有意に増大させる化合物を選択する。既知遺伝子プロモーターとしては、例えば SV40 ウイルス初期遺伝子や CMV の IE 遺伝子のプロモーター等を用いることができるが、特にそれらに限定されるわけではない。通常の発現活性を有する転写制御領域を用いれば良く、そのような DNA 構築物は、通常の実験技術を有する当業者によって、容易に構築可能である。

PPAR  $\delta$  等の転写制御に必要な配列部位については、通常、組換え DNA 実験の手法により、それらの必須配列を複数個タンデムに重複させた人工的な DNA 構築物を作

製することが可能である。このような人工的構築物を天然の配列と入れ換えて用いることにより、当該転写制御領域の転写誘導活性を増強させることができる場合がある。

さらに、PPAR $\delta$  アゴニスト活性を正確に測定する為に、上述の方法をさらに改良して生体内の状態に近づけることが可能である。生体内では PPAR $\delta$  は、RXR とヘテロダイマーを形成し、さらに PPAR $\delta$  のコアクチベーターと相互作用することによって、転写活性を発揮していることが判明している。従って、これらの蛋白質あるいは各蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする遺伝子を発現ベクターに連結して細胞に導入することによって、PPAR $\delta$  アゴニスト活性を有する化合物が、より生体内の状態に近い状態で PPAR $\delta$  転写系を駆動する作用が評価できる。各遺伝子は、同一のベクターに導入されてもよいし、別々のベクターであってもかまわない。RXR 遺伝子としては、たとえば、ヒト RXR $\alpha$  遺伝子(GenBank Accession No. NM\_002957)を用いることができる。また、コアクチベーターとしては、たとえば、ヒト CBP 遺伝子(GenBank Accession No. U47741) やヒト SRC-1 遺伝子(GenBank Accession No. U40396)を用いることができる。

PPAR レポーター遺伝子や PPAR $\delta$  遺伝子を含む DNA 構築物を動物細胞へ導入する方法としては、通常のりん酸カルシウム法・リポソーム法・リポフェクチン法や エレクトロポレーション法(electroporation 法, 電気穿孔法) などのいずれかによる形質転換方法を用いればよく、特に限定されない。より好ましくは、エレクトロポレーション法を用いればよい。

上述の方法により選択された PPAR $\delta$  にアゴニスト活性を示す化合物の中から、以下に示す方法により、優れた神経保護作用を有する好ましい性質を有する化合物を再選択することが可能である。即ち、本発明者らによる一連の実験(実施例1～実施例6)において実施されているように、PPAR $\delta$  アゴニスト由来の被験物質をある種の神経毒物質とともに細胞に添加して培養し、その生細胞数を、当該神経毒物質のみを添加した細胞の場合と比較する。そして、被験物質を作用させることによって、神経系に由来する細胞に対するある種の神経毒性を引き起こす化合物による神経細胞死が有意に抑制され、その致死的影響が緩和されて、細胞の生存率が上昇するような当該被験物質を選択する。

脳梗塞などによる神経細胞死については、未だその分子メカニズムの全貌が十分に判明している訳ではないが、神経毒性を引き起こす物質として例えば thapsigargin を用いることにより、通常の実験技術を有する当業者であれば、容易に、脳梗塞等の治療剤の有効成分としてより最適化された化合物選択の為に培養細胞を用いたアッセイ系を模擬的に構成することが可能である。thapsigargin (タプシガーギン) は、筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) や小胞体のカルシウムポンプに対する強力な阻害剤として知られている。カルシウムは細胞の応答の制御に広く使われており、細胞の恒常性を保つために、カルシウムポンプは非常に重要な働きを担っている。脳梗塞急性期の虚血状態において、脳梗塞巣周辺のニューロンにおける細胞内カルシウム濃度の乱れが、細胞死の一因となっていることを示唆する報告がある。

本アッセイ系に用いられる thapsigargin の濃度としては、1 nM 以上から 1  $\mu$ M 以下の濃度、より好ましくは 100 nM 程度が考えられる。thapsigargin の添加時期としては、被験化合物の添加時期の前でも同時でも後でも構わない。より好ましくは、被験化合物を添加して2時間後が望ましい。本アッセイ系における被験化合物の神経細胞保護活性は、thapsigargin 及び被験化合物が共存した状態で、一晚培養後、例えば次に示すいずれかの方法によって判定することができる。いずれも、通常の実験技術を有する当業者であれば、市販のキット製品のいずれかを用いて容易に実施することができる。

(1) MTT assay による生細胞数の測定

(2) LDH assay による死細胞数の測定

(3) Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

従って、本アッセイ系において、ある被験化合物を thapsigargin とともに細胞に添加して培養した場合に、thapsigargin のみを添加した場合と比較して、有意に細胞の生存率の上昇が見られれば、その被験化合物は、脳梗塞等の神経変性疾患治療に効果的な薬剤の有効成分である可能性を有すると推測される。

本アッセイ系に用いる培養細胞としては、ヒト神経細胞の性質を保持したものが望ましいが、ヒト神経細胞腫由来の株化細胞、より望ましくは SH-SY5Y 細胞を用いることができる。この細胞を用いることによって神経細胞の細胞死メカニズムに類似した *in vitro*

の細胞死アッセイ系が成立していると考えられる。実際に本アッセイ系において細胞死抑制効果のある両化合物 L-165041 及び GW501516 は *in vivo* 脳梗塞モデルにおいても有意に細胞死抑制効果を示しており *in vitro* と *in vivo* において非常に良い相関が確認されている。

5

一方、パーキンソン病による神経細胞死については、未だその分子メカニズムの全貌が十分に判明している訳ではないが、神経毒性を引き起こす物質として例えば MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) などを用いることにより、パーキンソン病の治療剤の有効成分としてより最適化された化合物選択の為の培養細胞を用いた細胞系を模擬的に構成することが可能である。神経毒の一種、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) は、人間や他の霊長類にパーキンソン症候群 (Parkinsonism) を引き起こすことが知られており、パーキンソン病の発症機構との関連から注目されている。MPTP は脳内に取り込まれた後、アストロサイトの中で monoamine oxidase B (MAOB) により MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridinium ion) に代謝  
10 されると考えられている。MPP<sup>+</sup> はドーパミン作動ニューロンの細胞膜に存在するドーパミントランスポーターによって、ドーパミンニューロン内に取り込まれる。さらに、ドーパミンニューロンに取り込まれた MPP<sup>+</sup> は、ミトコンドリアの電子伝達系の複合体 I を強く阻害することにより細胞毒性を発揮し、パーキンソン病症候群に似た症状を引き起こすといわれている。このような理由から、現在、内因性あるいは外因性の MPTP 類縁物質  
15 は、パーキンソン病の原因物質として疑われており、現在、各方面で、MPTP と類似の物質で、ドーパミン作動性ニューロンを選択的に阻害するような物質が食物などに含まれていないかどうかについて精力的な研究がなされている。また MPP<sup>+</sup> の神経毒性を緩和する薬剤は、パーキンソン病の治療薬としての可能性が期待される。

本アッセイ系に用いられる MPP<sup>+</sup> の濃度としては、100 nM 以上から 10 mM 以下の濃度、より好ましくは 3 mM 程度が考えられる。MPP<sup>+</sup> の添加時期としては、被験化合物の添加時期の前でも同時でも後でも構わない。より好ましくは、被験化合物を添加して2時間後が望ましい。本アッセイ系における被験化合物の神経細胞保護活性は、MPP<sup>+</sup> 及び被験化合物が共存した状態で、一晚培養後、例えば次に示すいずれかの方法によって判定することができる。いずれも、通常の実験技術を有する当業者であれば、市販  
25

のキット製品のいずれかを用いて容易に実施することができる。

(1) MTT assay による生細胞数の測定

(2) LDH assay による死細胞数の測定

(3) Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

5     本アッセイ系において、ある被験化合物を MPP+とともに細胞に添加して培養した場合に、MPP+のみを添加した場合と比較して、有意に細胞の生存率の上昇が見られれば、その被験化合物は、パーキンソン病治療に効果的な薬剤の有効成分である可能性を有すると推測される。

10     本アッセイ系に用いる培養細胞としては、理想的には、ヒト中脳黒質のドーパミン作動性神経細胞の性質を保持したものが望ましいと考えられるが、細胞死を生じる経路のか  
15     なりの部分は、神経系細胞全般に共通のメカニズムに拠っていることが予想される為、  
取扱いの比較的容易なヒト神経細胞腫由来の株化細胞で代用している。ヒト神経細胞  
腫由来の株化細胞であれば、いずれの細胞でも使用可能であるが、より望ましくは  
15     SH-SY5Y 細胞を用いることができる。この細胞を用いることによって、パーキンソン病に  
伴う神経細胞死のメカニズムの一部に類似した *in vitro* の細胞死アッセイ系が成立して  
いると考えられる。実際に本アッセイ系において細胞死抑制効果のある両化合物  
L-165041 及び GW501516 は *in vivo* パーキンソン病動物モデルにおいても有意に細胞  
死抑制効果を示しており *in vitro* と *in vivo* において非常に良い相関が確認されている。

20

さらに、神経毒性を引き起こす物質として、上記の thapsigargin や MPP+ を用いる代  
わりに例えば staurosporine を用いることによっても、通常の実験技術を有する当業者  
であれば、容易に、様々な神経変性疾患治療剤の有効成分としてより最適化された化  
合物選択の為の培養細胞を用いたアッセイ系を模擬的に構成することが可能である。

25     staurosporine は、*Streptomyces staurosporeus* が生産する微生物アルカロイドの一種  
で、数多くの様々な protein kinase 間で相同性の高い触媒領域に作用する非特異的な  
阻害剤として知られている。その詳しい分子メカニズムの全貌や疾患との関連について  
は、未だ十分に判明している訳ではないが、細胞内情報伝達において重要な機能を担  
う protein kinase 類を幅広く阻害することによって、神経細胞死をもたらす得ることが知ら



れている。たとえば、脳梗塞急性期の虚血状態においても、脳梗塞巣周辺のニューロンにおける細胞情報伝達経路の乱れが、細胞死の引き金を引く一因と考えられている。このような細胞内情報伝達の乱れは、数多くの神経変性疾患とも共通するメカニズムに収斂して、細胞死に到ると考えられる。

- 5      本アッセイ系に用いられる staurosporine の濃度としては、1 nM 以上から 1  $\mu$ M 以下の濃度、より好ましくは 150 nM 程度が考えられる。また、その添加時期としては、被験化合物の添加時期の前でも同時でも後でも構わない。より好ましくは、被験化合物を添加して2時間後が望ましい。本アッセイ系における被験化合物の神経細胞保護活性は、staurosporine 及び被験化合物が共存した状態で、一晚培養後、例えば次に示すいずれ
- 10      かの方法によって判定することができる。いずれも、通常の実験技術を有する当業者であれば、市販のキット製品のいずれかを用いて容易に実施することができる。

(1) MTT assay による生細胞数の測定

(2) LDH assay による死細胞数の測定

(3) Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

- 15      従って、本アッセイ系において、ある被験化合物を staurosporine とともに細胞に添加して培養した場合に、staurosporine のみを添加した場合と比較して、有意に細胞の生存率の上昇が見られれば、その被験化合物は、脳梗塞等の神経変性疾患治療に効果的な薬剤の有効成分である可能性を有すると推測される。また、本アッセイ系に用いる培養細胞としては、ヒト神経細胞の性質を保持したものが望ましいが、ヒト神経細胞腫由来の株化細胞、より望ましくは SH-SY5Y 細胞を用いることができる。この細胞を用いる
- 20      ことによって神経細胞の細胞死メカニズムに類似した *in vitro* の細胞死アッセイ系が成立していると考えられる。実際に本アッセイ系において細胞死抑制効果のある両化合物 L-165041 及び GW501516 は *in vivo* 脳梗塞モデルにおいても有意に細胞死抑制効果を示しており *in vitro* と *in vivo* において非常に良い相関が確認されている。

25

即ち、本発明における『細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択されたPPAR  $\delta$  アゴニスト』とは、前述のreporter gene assay 法等の公知の方法により選択されたPPAR  $\delta$  アゴニストから、上述の thapsigargin, MPP<sup>+</sup>, またはstaurosporine を添加した培養細胞を用いる方法によって、さらに顕著な細胞死抑制活性を示すもののみを再選

択することによって得られた化合物をいう。細胞死抑制活性の強さとしては、例えば、0.1-100  $\mu$ M の範囲で最適濃度の当該化合物を添加して前述の条件下でMTT assay法で測定した生存細胞の数が、添加しない場合に比較して、少なくとも10%、より好ましくは30%以上、さらに好ましくは50%以上改善するものが望ましい。

5

本発明は、PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療方法及び治療剤に関する。

10 前述の評価方法に基づいて、PPAR $\delta$  アゴニストを選択することにより得られた化合物は、神経細胞の変性によって発症すると思われる以下のような疾患の治療や予防に有用である。

アルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害。

15

本発明における PPAR $\delta$  アゴニストを医薬品として用いる場合には、それ自体として医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。本治療剤は、経口剤、非経口剤または外用剤のいずれの形態でも提供可能であるが、治療対象とする疾患に適合した投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。例えば、注射剤、点滴剤、シロップ剤、錠剤、顆粒剤、粉末、20 トローチ剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤、坐剤、クリーム剤、軟膏剤、エアロゾル剤、吸入用散剤、液剤、乳剤、懸濁剤、腸溶コーティング剤、噴霧剤、点眼剤、点鼻剤やその他の使用に適した任意の他の剤型が可能であり、医薬上許容し得る通常の無毒性担体と混合できる。さらに、必要に応じて、補助剤、安定剤、増粘剤、着色剤、香料を用いてもよい。このような医薬製剤は、賦形剤(例えば、スクロース、デンプン、マンニット、ソルビット、ラクトース、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等)、結合剤(例えば、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコー

25

ル、スクロース、デンプン等)、崩壊剤(例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、エアロシル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等)、矯味剤(例えば、クエン酸、メントール、グリシン、オレンジ末等)、保存剤  
5 (例えば、安息香酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等)、安定化剤(例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等)、懸濁化剤(例えば、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等)、分散剤(例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等)、希釈剤(例えば水等)、基材ワックス(例えば、カカオバター、白色ワセリン、ポリエチレングリコール等)のような製剤化に慣用の有機  
10 または無機の各種担体を用いる常法によって製造することができる。

これらの製剤化にあたっては、医薬組成物には、医薬上許容し得る塩が、疾患の過程または状態に対して所望の医薬的效果を奏するのに十分な量含有されてもよく、それらは、例えば固形、半固形または液状の医薬製剤の形態で使用できる。そのような医薬として許容される塩は、慣用の無毒性の塩であって、具体的には、アルカリ金属塩(例  
15 えば、ナトリウム塩またはカリウム塩)およびアルカリ土類金属塩(例えば、カルシウム塩またはマグネシウム塩)のような金属塩、無機酸付加塩(例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)、有機カルボン酸またはスルホン酸付加塩(例えば、蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、塩基性または酸性アミノ酸(例えば、  
20 アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等)との塩を挙げることができる。

患者への投与は、鼻、眼、外部(局所)、直腸、肺(鼻または口内注入)、経口または非経口(脳室内、皮下、静脈および筋肉内を含む)投与または吸入に適している。注射剤の投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の公知の方法により行な  
うことができる。

25 本発明の治療剤の投与量は、所望の治療効果を生じるに足りる量であればよい。当該化合物の治療有効量は、例えば非経口投与による場合には、通常は、1日当たり約0.1~100mg、好ましくは1~16mgを投与することが好ましい。有効な1回投与量は、患者の体重1kg当たり0.001~1mgの範囲、好ましくは0.01~0.16mgの範囲内で選択される。しかしながら、上記の投与量は、処置すべき各個の患者の体重、年齢及び病状、並

びに、用いる投与方法等により変わるものである。通常の実験手法を有する当業者であれば、動物実験等のデータを基にして、より適切な投与量を適宜選択することが可能である。

図面の簡単な説明発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されない。また本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例1 thapsigargin 誘発細胞死モデル(神経変性疾患モデル)における PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(1): <方法> MTT assay による生細胞数の測定

10 96-well plate に SH-SY5Y 細胞を広げて (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)、一晩培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 600 nM Thapsigargin を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。

15 (thapsigargin 最終濃度 100 nM) (control は DMEM without Serum のみ)

24時間後 Celltiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit (Promega)を用いて 490 nm の吸光度から生細胞数を測定した。

表1は、このようにして求めた各種濃度の L-165041 または GW501516 の添加と生細胞数の関係を示している。この結果は、thapsigargin 誘発細胞死に対する PPAR $\delta$  アゴニストの抑制効果を示している。

20

【表1】

	( $\cdot$ M)	Thapsigargin	MTT assay $A_{490}$
L-165041	0	-	0.5536 $\pm$ 0.0060
	0	+	0.2156 $\pm$ 0.0043
	0.1	+	0.2176 $\pm$ 0.0036
	1	+	0.2158 $\pm$ 0.0034
	10	+	0.2436 $\pm$ 0.0015**
	100	+	0.4405 $\pm$ 0.0065**
GW501516	0	-	0.7658 $\pm$ 0.0048
	0	+	0.2823 $\pm$ 0.0070
	0.1	+	0.2978 $\pm$ 0.0096
	1	+	0.3150 $\pm$ 0.0135
	10	+	0.3478 $\pm$ 0.0110**
	100	+	0.2950 $\pm$ 0.0033**

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, thapsigargin-only treatment に対して)

5

表1の  $A_{490}$  の各測定値は、独立した4実験(n=4)における平均値 $\pm$ 標準誤差で示している。PPAR $\delta$ アゴニストで処理していないコントロール群のうち、thapsigargin 処理した群と未処理群の2群間については、Student's t-testにより比較検定を行ない、p<0.01で有意差が見られることを確認した。thapsigargin 及び各種濃度の PPAR $\delta$ アゴニスト (L-165041 または GW501516)で処理した各群を比較検定するに際しては、one-way ANOVA で各群の分散の違いを確認後、Dunnett's test を行なった。表1では、p<0.01で有意差の見られたものを\*\*で示している。

10

本アッセイ系はニューロブラストーマ SH-SY5Y に小胞体  $Ca^{2+}$ ATPase の阻害剤である thapsigargin(TG)を加えることにより小胞体ストレスが起因となって細胞死を誘発させている。小胞体ストレスによる細胞死は虚血時の神経細胞死の原因であると考えられており、本アッセイ系は虚血時の神経細胞死を模倣して作られたアッセイ系であることが言える。本実験により、L-165041 と GW501516 が濃度依存的に thapsigargin(TG)によって誘発される細胞死を抑制していることが示された。(GW501516 は 100  $\mu$ M の濃度においては細胞毒性が観察される。)

15

20

実施例2 thapsigargin 誘発細胞死モデル(神経変性疾患モデル)における PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(2): <方法> LDH assay による死細胞数の測定

- 5 96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 600 nM thapsigargin DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。
- 10 (thapsigargin 最終濃度 100 nM) (control は DMEM without Serum のみ)
- 24時間後 Cytotoxicity detection kit (Roche)を用いて 490 nm の吸光度を測定することにより LDH 活性の測定を行なった。表2は、このようにして求めた LDH アッセイによる死細胞数の定量結果を示す。実施例1において MTT アッセイにより求めた生細胞数定量による結果とは、明らかな相関が見られた。以上の結果は、thapsigargin 誘発細胞死
- 15 に対して PPAR $\delta$  アゴニストが抑制効果を示すことを明らかにしている。

【表2】

1)	Thapsigargin	LDH release
		A <sub>490</sub>
L-165041	-	0.2258 $\pm$ 0.0049
	+	0.6750 $\pm$ 0.0106
	+	0.6758 $\pm$ 0.0183
	+	0.6295 $\pm$ 0.0139
	+	0.6029 $\pm$ 0.0135**
	+	0.2987 $\pm$ 0.0128**
GW501516	-	0.1088 $\pm$ 0.0060
	+	0.5413 $\pm$ 0.0171
	+	0.6225 $\pm$ 0.0229
	+	0.5750 $\pm$ 0.0212
	+	0.3325 $\pm$ 0.0259**
	+	0.6675 $\pm$ 0.0328**

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, thapsigargin-only treatment に対して)

20

実施例3 thapsigargin 誘発細胞死モデル(神経変性疾患モデル)における PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(3): <方法> Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

- 5 96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 600 nM thapsigargin を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。
- 10 (thapsigargin 最終濃度 100 nM) (control は DMEM without Serum のみ)
- 3 時間後 Apo-One homogenous Caspase-3/7 assay kit(Promega)を用いて Caspase-3/7 の活性を測定した。表3にその結果を示す。

- PPAR $\delta$  アゴニスト L-165041 及び GW501516 は、アポトーシスが誘発された際に活性化される Caspase-3/7 の活性を抑制することから、これら両化合物は直接ないしは間接的にアポトーシスシグナルを抑制することにより thapsigargin 誘発細胞死に対する抑制効果を示していることが明らかとなった。
- 15

【表3】

	( $\mu$ M)	thapsigargin	Caspase 3/7 activity RFLU
L-165041	0	-	147789 $\pm$ 5193
	0	+	702332 $\pm$ 14470
	0.1	+	732549 $\pm$ 24888
	1	+	652843 $\pm$ 8229
	10	+	554233 $\pm$ 23703**
	100	+	242770 $\pm$ 5414**
GW501516	0	-	159016 $\pm$ 2356
	0	+	276057 $\pm$ 11115
	0.1	+	226861 $\pm$ 8501*
	1	+	237165 $\pm$ 5248
	10	+	125951 $\pm$ 6465**
	100	+	421972 $\pm$ 21782

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

20 \* P<0.05, \*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test,



thapsigargin-only treatment (に対して)

実施例4 MPP+誘発細胞死モデル(パーキンソン病モデル)における PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(1): <方法> MTT assay による生細胞数の測定

96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、

2時間後 18 mM MPP+を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。(MPP+ 最終濃度 3 mM) (control は DMEM without Serum のみ)

24時間後 Celltiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit (Promega)を用いて 490 nm の吸光度を測定することにより、細胞増殖活性の測定した。表4にその結果を示す。この結果は、MPP+誘発細胞死に対して PPAR  $\delta$  アゴニストが抑制効果を示すことを明らかにしている。

本アッセイ系はニューロblastーマ SH-SY5Y に MPTP の代謝物である MPP+を加えることによりミトコンドリアの complex I を阻害し活性酸素の発生や ATP 合成阻害が起因となって細胞死を誘発させている。パーキンソン病のモデルとしてよく使われているマウスの MPTP モデルは脳関門を通過した MPTP が代謝されて MPP+となることによりマウスの黒質細胞特異的に毒性を示して神経脱落を引き起こすとされている。よって今回のアッセイ系はマウス MPTP モデルを模倣した *in vitro* アッセイであると言える。L-165041 と GW501516 は濃度依存的に MPP+によって誘発される細胞死を抑制していることが本実験から証明された。

【表4】

			MTT assay
			A <sub>490</sub>
L-165041	0	-	0.5448 ± 0.0041
	0	+	0.3392 ± 0.0048
	0.1	+	0.3744 ± 0.0067*
	1	+	0.3935 ± 0.0083**
	10	+	0.4799 ± 0.0078**
	100	+	0.3181 ± 0.0122
	100	+	0.3181 ± 0.0122
GW501516	0	-	0.7447 ± 0.0054
	0	+	0.3178 ± 0.0031
	0.1	+	0.3361 ± 0.0073
	1	+	0.3926 ± 0.0090**
	10	+	0.3814 ± 0.0156**
	100	+	0.2990 ± 0.0144
	100	+	0.2990 ± 0.0144

平均±標準誤差 (n=4)

\* P<0.05, \*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, MPP+-only treatment に対して)

5

実施例5 MPP+誘発細胞死モデル(パーキンソン病モデル)における PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(2): <方法> LDH assay による死細胞数の測定

96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 18 mM MPP+を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。(MPP+ 最終濃度 3 mM) (control は DMEM without Serum のみ)

24時間後 Cytotoxicity detection kit (Roche)を用いて LDH 活性から死細胞数を測定した。表5にその結果を示す。この結果は、MPP+誘発細胞死に対して PPAR $\delta$  アゴニストが抑制効果を示すことを明らかにしている。実施例4による細胞数の定量結果と本実験の LDH アッセイによる死細胞数の結果に相関が見られたことより、L-165041 と GW501516 が濃度依存的に MPP+によって誘発される細胞死を抑制していることが確認された。(ただし、本アッセイ条件では、100  $\mu$ M の濃度においては、L-165041 と GW501516 のいずれも細胞毒性を示すことが観察された。)

20

【表5】

	( $\mu$ M)	MPP+	LDH release A <sub>490</sub>
L-165041	0	-	0.2807 $\pm$ 0.0058
	0	+	0.4617 $\pm$ 0.0081
	0.1	+	0.3980 $\pm$ 0.0141**
	1	+	0.3874 $\pm$ 0.0120**
	10	+	0.3133 $\pm$ 0.0024**
	100	+	0.6709 $\pm$ 0.0093
GW501516	0	-	0.1610 $\pm$ 0.0052
	0	+	0.3772 $\pm$ 0.0187
	0.1	+	0.3633 $\pm$ 0.0153
	1	+	0.3222 $\pm$ 0.0207*
	10	+	0.2981 $\pm$ 0.0154**
	100	+	0.7969 $\pm$ 0.0251

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\* P<0.05, \*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, MPP+-only treatment に対して)

実施例6 MPP+誘発細胞死モデル(パーキンソン病モデル)における PPAR $\delta$ -アゴニストの細胞死抑制作用(3): <方法> Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晩培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 18 mM MPP+を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。(MPP+ 最終濃度 3 mM) (control は DMEM without Serum のみ)

3 時間後 Apo-One homogenous Caspase-3/7 assay kit(Promega)を用いて Caspase-3/7 の活性を測定した。表6にその結果を示す。

PPAR $\delta$ アゴニスト L-165041 と GW501516 は、いずれも濃度依存的に Caspase-3/7 の活性を抑制しており、この結果から、これら両化合物は直接ないし間接的にアポトーシスシグナルを抑制することにより MPP+によって誘発される細胞死に対する抑制効果を

発揮していることが示唆される。

【表6】

	( $\mu$ M)	MPP+	Caspase 3/7 activity RFLU
L-165041	0	-	185992 $\pm$ 3185
	0	+	1455497 $\pm$ 28684
	0.1	+	1430206 $\pm$ 30804
	1	+	1168920 $\pm$ 30554**
	10	+	646736 $\pm$ 26366**
	100	+	572152 $\pm$ 33695**
GW501516	0	-	114533 $\pm$ 5938
	0	+	933722 $\pm$ 18553
	0.1	+	847552 $\pm$ 36575
	1	+	621059 $\pm$ 26590**
	10	+	798646 $\pm$ 54365
	100	+	398604 $\pm$ 55698**

5 平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\* P<0.05, \*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, MPP+-only treatment に対して)

10 参考例1 *in vitro* reporter gene assay による L-165041 及び GW501516 の作用プロファイルと PPAR 選択性:

ヒト PPAR $\alpha$  cDNA、ヒト PPAR $\delta$  cDNA、ヒト PPAR $\gamma$  cDNA、マウス PPAR $\alpha$  cDNA、マウス PPAR $\delta$  cDNA、マウス PPAR $\gamma$  cDNA のそれぞれを、発現ベクター-pBIND (Promega 社製)のマルチクローニングサイトに導入して GAL4-ヒト PPAR $\alpha$  融合蛋白  
 15 発現ベクター-pBINDhPPAR $\alpha$ 、GAL4-ヒト PPAR $\delta$  融合蛋白発現ベクター-pBINDhPPAR $\delta$ 、GAL4-ヒト PPAR $\gamma$  融合蛋白発現ベクター-pBINDhPPAR $\gamma$ 、GAL4-マウス PPAR $\alpha$  融合蛋白発現ベクター-pBINDmPPAR $\alpha$ 、GAL4-マウス PPAR $\delta$  融合蛋白発現ベクター-pBINDmPPAR $\delta$ 、GAL4-マウス PPAR $\gamma$  融合蛋白発現ベクター-pBINDmPPAR $\gamma$ を構築した。これらの発現ベクターそれぞれを、レポーター遺伝子発現用のベクター-pG5luc  
 20 (Promega 社製)とともに、LipofectAMINE Reagent (GIBCO BRL 社製)を用いて African

- green monkey kidney 由来の CV-1 細胞に導入し、被験化合物である L-165041 又は GW501516 を添加後、37°C、5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度条件下で一晩培養し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社製)を用いて、Firefly luciferase 活性、及び Renilla luciferase 活性を求めた。PPAR の各サブタイプによる転写活性化作用は、pG5luc のレポーターである Firefly luciferase の活性から求め、pBIND に由来する Renilla luciferase 活性を内部標準に用いた。表 7 に、このようにして測定された *in vitro* reporter gene assay による L-165041 及び GW501516 の作用プロファイルと PPAR 選択性を示す。

【表 7】

	L-165041 作用発現濃度(・M)	GW501516 作用発現濃度(・M)
ヒト PPAR- $\alpha$	10	1
ヒト PPAR- $\beta$	10	>10
ヒト PPAR- $\gamma$	0.1	<0.01
マウス PPAR- $\alpha$	>100	10
マウス PPAR- $\beta$	10	>10
マウス PPAR- $\gamma$	0.1	0.01

10

## 実施例 7

ラット脳梗塞モデルにおける PPAR- $\alpha$  アゴニストの作用:

- ラット脳梗塞モデルに対する各種化合物の評価を行ったところ、L-165041(PPAR- $\delta$  アゴニスト)及び GW501516(PPAR- $\delta$  アゴニスト)が強い脳梗塞縮小作用を有することが確認された。

### <方法> 脳梗塞モデル(小泉法)による PPAR- $\delta$ アゴニストの評価

L-165041 及び GW501516 はポリエチレングリコール(PEG300)に溶解した。薬剤は予め

無菌的に薬物を充填した ALZET 浸透圧ミニポンプで Wistar 系雄性ラット(9 週齢)に投与した。脳虚血手術前日に右側脳室内、即ち頭蓋の冠状縫合より後方 0.8mm, 右側方 1.5mm, 深さ 4.0mm にガイドカニューレを挿入し、1 $\mu$ L/hour の流速で脳室内持続投与を開始した。対照群には溶媒を同様に投与した。投与は屠殺時まで行った。脳梗塞モデルとして小泉法により中大脳動脈閉塞再開通モデルを用いた。即ち、ハロセン麻酔下(導入 4%, 維持 1.5%)で右総頸動脈分岐部よりシリコンコーティングした長さ 19mm の 4-0 ナイロン栓子を内頸動脈に向けて挿入し、右中大脳動脈を閉塞した。虚血 90 分後に再麻酔下でナイロン栓子を抜去することにより再開通した。脳虚血再開通の 24 時間後に脳を摘出し、厚さ 2mm の連続冠状切片を作製した。この切片を 2% TTC (Triphenyltetrazolium Chloride) 溶液で染色し、脳傷害面積を測定し脳傷害率を算出した。

表8にそのようにして得られた脳傷害面積の測定結果、表9に脳梗塞縮小作用の評価結果を示す。

表9の結果は、脳梗塞モデル(小泉法)において L-165041 及び GW501516 がいずれも用量依存的に脳傷害縮小作用を示すことを表している。さらに、脳傷害縮小作用は、GW501516 により著しく認められた。この両剤による脳梗塞縮小作用の強さの違いは、*in vitro* reporter gene assay により測定されたヒト及びマウス PPAR- $\delta$ アゴニスト作用の強さの違いとよく相関する(表7)。これらの結果は、PPAR- $\delta$ アゴニストが一般的に脳梗塞縮小作用を有することを示唆している。

20

【表8】

ラット脳梗塞モデルでの PPAR- $\delta$  agonist の作用

脳梗塞巣 (6 切片中の傷害部位の面積%)

	対照群	L-165041		GW501516	
		24	240	24	240
$\mu$ g/head/day					
例数	(n=8)	(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=9)
Total	23.68 $\pm$ 1.96	22.68 $\pm$ 0.83	19.40 $\pm$ 1.98	18.74 $\pm$ 2.00	15.14 $\pm$ 2.20*
Cortex	13.93 $\pm$ 1.23	12.70 $\pm$ 0.63	10.22 $\pm$ 1.29*	9.39 $\pm$ 1.56	7.26 $\pm$ 1.67*
Subcortex	9.74 $\pm$ 0.82	9.98 $\pm$ 0.30	9.19 $\pm$ 0.85	9.35 $\pm$ 0.65	7.88 $\pm$ 0.79

平均±標準誤差

\*  $P < 0.05$  (one way ANOVA followed by Dunnett's test, 対照群に対して)

【表9】

脳梗塞縮小作用

	L-165041		GW501516	
i.c.v. ( $\mu$ g/head/day)	24	240	24	240
大脳皮質傷害縮小率	9%	27%	33%	48%

5

## 実施例 8

マウス MPTP パーキンソン病モデルにおける PPAR- $\delta$  アゴニストの作用

PPAR- $\delta$  アゴニストの in vivo での神経保護作用を探索することを目的として、マウス

10 MPTP パーキンソン病モデルを用いて検討した。

### <方法> マウス MPTP パーキンソン病モデルによる PPAR- $\delta$ アゴニストの評価

9 週齢の非絶食 C57BL/6 系雄性マウスを pentobarbital (60mg/kg, i.p.)にて麻酔後、  
脳定位固定装置に固定し、L型カニューレを頭蓋骨に固定(0.0mm to Bregma, 1.2mm  
15 lateral to midline, 2.5mm ventral from skull)し ALZET 浸透圧ポンプを背部皮下に埋め込  
んだ。PPAR- $\delta$  アゴニスト(L-165041, GW501516)を、30% DMSO/saline に溶解し、ろ過  
滅菌後、浸透圧ポンプに無菌的に充填して、0.5  $\mu$ L/hr の速度で、1 日当り 12  $\mu$ g 又は  
120  $\mu$ g を、脳室内に持続投与した。ポンプ埋め込みの2日後に、MPTP(20mg/kg)を 2 時  
間間隔で2回、腹腔内投与した。MPTP 投与の 4 日後に線条体を摘出し、線条体中の  
20 dopamine (DA)及びその代謝物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC),  
homovanillic acid (HVA) の含量を HPLC-ECD (high-performance liquid  
chromatography with electrochemical detection)で測定した。

表10は、このようにして定量されたMPTPパーキンソンモデルにおける線条体湿重量  
あたりの DA 及びその代謝物の含量を示している。また、表11は、表10の結果から計  
25 算される DA 及びその代謝物の含量の回復率を示している。これらの結果は、マウス  
MPTP パーキンソン病モデルにおいて、PPAR- $\delta$ アゴニストが、MPTP による線条体中の

DA 及びその代謝物である DOPAC, HVA の含量の低下を抑制する作用があることを示している。DA 及びその代謝物である DOPAC, HVA の含量の低下抑制作用は、L-165041 では、投与量  $12 \mu\text{g/head/day}$  ではあまり顕著でないが、 $120 \mu\text{g/head/day}$  では、顕著に認められ、GW501516 では、いずれの投与量でも顕著に認められた。これら両剤による DA 含量の低下抑制作用の強さの違いは、*in vitro* reporter gene assay により測定されたヒト及びマウス PPAR- $\delta$ アゴニスト作用の強さの違いとよく相関する(表 7)。これらの結果は、これら化合物による線条体 DA 及びその代謝物の含量の低下抑制作用が、一般的に、PPAR- $\delta$ に対するアゴニスト活性に拠っていることを示唆している。

【表10】

MPTP パーキンソン病モデルにおける線条体湿重量あたりの DA 及びその代謝物の含量

	投与量 ( $\mu\text{g/head/day}$ )	MPTP treatment	含量		
			DA (ng/mg tissue)	DOPAC (ng/mg tissue)	HVA (ng/mg tissue)
Normal	0	-	$15.59 \pm 0.38$	$0.76 \pm 0.03$	$1.31 \pm 0.02$
Control	0	+	$5.01 \pm 0.39$	$0.29 \pm 0.02$	$0.68 \pm 0.03$
GW501516	12	+	$7.41 \pm 1.27$	$0.39 \pm 0.06$	$0.82 \pm 0.08$
	120	+	$8.98 \pm 1.20^*$	$0.44 \pm 0.04^*$	$0.90 \pm 0.05^{**}$
L-165041	12	+	$5.06 \pm 1.08$	$0.28 \pm 0.05$	$0.66 \pm 0.08$
	120	+	$7.81 \pm 0.93^*$	$0.44 \pm 0.07$	$0.91 \pm 0.10$

平均 $\pm$ 標準誤差

normal 群: n=6, control 群: n=6, その他の各群: n=7

\*  $P < 0.05$  (Student's t-test vs control)

\*\*  $P < 0.01$  (Student's t-test vs control)



【表11】

MPTP パーキンソン病モデルにおける DA 及びその代謝物の含量の回復率

	投与量 ( $\mu$ g/head/day)	MPTP treatment	含量		
			DA (%)	DOPAC (%)	HVA (%)
Normal	0	-	100.00 $\pm$ 3.56	100.00 $\pm$ 6.18	100.00 $\pm$ 3.05
Control	0	+	0.00 $\pm$ 3.67	0.00 $\pm$ 4.44	0.00 $\pm$ 4.27
GW50151 6	12	+	22.67 $\pm$ 12.00	21.72 $\pm$ 11.73	21.42 $\pm$ 12.07
	120	+	37.53 $\pm$ 11.33*	32.44 $\pm$ 9.17*	33.93 $\pm$ 8.72**
L-165041	12	+	0.42 $\pm$ 10.20	-1.45 $\pm$ 10.89	-4.65 $\pm$ 12.88
	120	+	26.42 $\pm$ 8.83*	32.22 $\pm$ 15.41	36.58 $\pm$ 16.68

平均 $\pm$ 標準誤差

5 \* P&lt;0.05 (Student' s t-test vs control)

\*\* P&lt;0.01 (Student' s t-test vs control)

## 実施例 9

10 Staurosporine 誘発細胞死モデルにおける PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用 (1):

ニューロブラストーマ SH-SY5Y に protein kinase の阻害剤である Staurosporine を加えることにより細胞死を誘発させ、PPAR  $\delta$  アゴニストによる細胞死抑制効果を調べた。

<方法> MTT assay による生細胞数の測定

15 96-well plate に SH-SY5Y 細胞を広げて (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)、一晩培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM

without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、2時間後 900 nM Staurosporine を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。(staurosporine 最終濃度 150 nM) (control は DMEM without Serum のみ)

- 5 24時間後 Celltiter 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit (Promega)を用いて 490 nm の吸光度から生細胞数を測定した。

表1は、このようにして求めた各種濃度の L-165041 または GW501516 の添加と生細胞数の関係を示している。この結果は、staurosporine によって誘発される細胞死に対して PPAR $\delta$  アゴニスト(L-165041, GW501516) が濃度依存的に抑制効果を有することを示している。

【表12】

		MTT assay	
	( $\mu$ M)	Staurosporine	$A_{490}$
L-165041	0	—	0.6607 $\pm$ 0.0022
	0	+	0.4249 $\pm$ 0.0086
	0.1	+	0.5523 $\pm$ 0.0209**
	1	+	0.5532 $\pm$ 0.0056**
	10	+	0.5167 $\pm$ 0.0098**
GW501516	0	—	0.6608 $\pm$ 0.0023
	0	+	0.4250 $\pm$ 0.0087
	0.1	+	0.5179 $\pm$ 0.0140**
	1	+	0.5367 $\pm$ 0.0149**
	10	+	0.5860 $\pm$ 0.0086**

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

- 15 \*\* P<0.01(one-way ANOVA followed by Dunnett's test, staurosporine-only treatment に対して)

#### 実施例 11

staurosporine 誘発細胞死モデルにおける PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用(2):

<方法> LDH assay による死細胞数の測定

- 20 96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を

含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、  
2 時間後 900 nM Staurosporine DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。  
(staurosporine 最終濃度 150 nM) (control は DMEM without Serum のみ)

24 時間後 Cytotoxicity detection kit (Roche)を用いて 490 nm の吸光度を測定することにより LDH 活性の測定を行なった。表2は、このようにして求めた LDH アッセイによる死細胞数の定量結果を示す。実施例9において MTT アッセイにより求めた生細胞数定量による結果とは、明らかな相関が見られた。以上の結果は、Staurosporine 誘発細胞死に対して PPAR $\delta$  アゴニストが抑制効果を示すことを明らかにしている。

10 【表13】

		LDH release	
		( $\mu$ M)	Staurosporine
		A <sub>490</sub>	
L-165041	0	—	0.1315 $\pm$ 0.0042
	0	+	0.6058 $\pm$ 0.0181
	0.1	+	0.5330 $\pm$ 0.0298
	1	+	0.5230 $\pm$ 0.0160
	10	+	0.5319 $\pm$ 0.0267
GW-501516	0	—	0.1315 $\pm$ 0.0042
	0	+	0.6058 $\pm$ 0.0181
	0.1	+	0.5430 $\pm$ 0.0264
	1	+	0.5201 $\pm$ 0.0313
	10	+	0.4025 $\pm$ 0.0188**

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\*\* P<0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnett's test, staurosporine-only treatment に対して)

15

## 実施例 11

Staurosporine 誘発細胞死モデルにおける PPAR- $\delta$  アゴニストの細胞死抑制作用

(3): <方法> Caspase-3/7 assay によるアポトーシス検出

96-well plate に SH-SY5Y 細胞を plating (70,000 cells/well in 100  $\mu$ l DMEM low glucose 10% fetal bovine serum)し、一晚培養後、培地をアスピレーターで除き DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加えた。2倍濃度の薬剤(L-165041 または GW501516)を含んだ DMEM without Serum を 50  $\mu$ l/well 加え(Back は DMEM without Serum のみ)、

20

2時間後 900 nM staurosporine を含んだ DMEM without Serum を 20  $\mu$ l/well 加えた。  
(staurosporine 最終濃度 150 nM) (control は DMEM without Serum のみ)

3 時間後 Apo-One homogenous Caspase-3/7 assay kit(Promega) を用いて  
Caspase-3/7 の活性を測定した。表3にその結果を示す。

- 5 PPAR  $\delta$  アゴニスト L-165041 及び GW501516 は、アポトーシスが誘発された際に活性化される Caspase-3/7 の活性を抑制することから、これら両化合物は直接ないしは間接的にアポトーシスシグナルを抑制することにより staurosporine 誘発細胞死に対する抑制効果を示していることが明らかとなった。

10 【表14】

	( $\mu$ M)	Staurosporine	Caspase 3/7 activity RFLU
L-165041	0	-	104281 $\pm$ 3078
	0	+	614433 $\pm$ 39923
	0.1	+	535404 $\pm$ 23301
	1	+	520732 $\pm$ 17273
	10	+	483017 $\pm$ 27259*
GW501516	0	-	104281 $\pm$ 3078
	0	+	614433 $\pm$ 39923
	0.1	+	586295 $\pm$ 18787
	1	+	463943 $\pm$ 12110**
	10	+	420844 $\pm$ 13962**

平均 $\pm$ 標準誤差 (n=4)

\* P<0.05, \*\* P<0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnett's test, staurosporine-only treatment に対して)

## 15 産業上の利用の可能性

本発明によれば、PPAR  $\delta$  アゴニストを thapsigargin, MPP+, staurosporine 等の毒素を作用させた培養細胞系に添加して生存率を向上させる化合物を再選択することにより、神経細胞に対して保護作用を有する化合物を再選択することが可能である。このような方法で選択された化合物は、脳梗塞やパーキンソン病などの神経変性疾患治療剤の有効成分として用いることができ、新薬創出の為に研究に極めて有用である。

## 請求の範囲

1. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤。  
5
2. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによるアルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療方法。  
10
3. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む脳梗塞の治療剤。
4. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含むパーキンソン病の治療剤。  
15
5. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによる脳梗塞の治療方法。
6. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む薬剤を投与することによるパーキンソン病の治療方法。  
20
7. PPAR $\delta$  アゴニストが、細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである請求項1, 3, 4に記載の治療剤。
- 25 8. PPAR $\delta$  アゴニストが、細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである請求項2, 5, 6に記載の治療方法。
9. PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの請求項1, 3, 4に記載の治療剤。

10. PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの請求項2, 5, 6 に記載の治療方法。

5 11. アルツハイマー病、パーキンソン病、脳梗塞、頭部外傷、脳出血、脊髄損傷、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、糖尿病性あるいは薬物誘発性の末梢神経障害または網膜神経障害の治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

12. 脳梗塞治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

10

13. パーキンソン病治療剤製造の為の PPAR $\delta$  アゴニストの使用。

14. PPAR $\delta$  アゴニストが細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである請求項11-13記載の使用。

15

15. PPAR $\delta$  アゴニストが細胞死抑制活性を指標として特異的に再選択された PPAR $\delta$  アゴニストである請求項11-13記載の使用。

16. PPAR $\delta$  アゴニストを有効成分として含む中枢神経細胞死抑制剤。

20

17. PPAR $\delta$  アゴニストが、L-165041 または GW501516 であるところの請求項16に記載の中枢神経細胞死抑制剤。

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005429

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K31/192, A61K31/426, A61P25/28, A61P25/16,  
A61P9/10, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K45/00, A61K31/192, A61K31/426, A61P25/28, A61P25/16,  
A61P9/10, A61P21/00, A61P25/00, A61P25/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CAP (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X P, Y	WO 03/33493 A1 (NIPPON CHEMIPHAR CO.), 24 April, 2003 (24.04.03), Full text (Family: none)	1, 7, 11, 14, 15 1, 3, 4, 7, 9, 11-17
X Y	WO 02/100836 A2 (ACTIVE PASS PHARM. INC.), 19 December, 2002 (19.12.02), Full text; Claims; page 43, line 14 to page 46, the last line; examples & US 2003/125338 A & US 2003/191144 A & EP 1399426 A2	1, 7, 11, 14, 15 1, 3, 4, 7, 9, 11-17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
20 July, 2004 (20.07.04)

Date of mailing of the international search report  
10 August, 2004 (10.08.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005429

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/28433 A2 (GLAXO GROUP LTD.), 11 April, 2002 (11.04.02), Full text; Claims; page 3, lines 11, 24 to 31; pages 21 to 24 & AU 2001/92044 B & US 2004/29938 A & JP 2004-510749 A	1,4,7,11, 13-15 1,3,4,7,9, 11-17
X Y	WO 99/4815 A1 (YAMANOUCHI PHARM. CO., LTD.), 04 February, 1999 (04.02.99), Full text; page 13, lines 4, 5; examples 1, 2 & AU 98/83559 B & EP 1023907 A1	1,3,7,11,12, 14,15 1,3,4,7,9, 11-17
X Y	JP 2001-354671 A (NIPPON CHEMIPHAR CO.), 25 December, 2001 (25.12.01), Full text; Claim 11; page 28, column 53, lines 5 to 6; example 10 & WO 01/79197 A1 & AU 2001/42747 B	1,7,11,14,15 1,3,4,7,9, 11-17
X Y	WO 03/16291 A1 (NIPPON CHEMIPHAR CO.), 27 February, 2003 (27.02.03), Full text; Claim 18; page 32, lines 10 to 11; examples 51 to 53	1,7,11,14,15 1,3,4,7,9, 11-17
X Y	WO 02/76957 A1 (NIPPON CHEMIPHAR CO.), 03 October, 2002 (03.10.02), Full text; page 17, lines 30 to 50; example 3 & EP 1371650 A1 & AU 2002/232243 B	1,7,11,14,15 1,3,4,7,9, 11-17
A	JP 2003-505058 A (The University of Dundee), 12 February, 2003 (12.02.03), Full text; Claims 9, 20, 22, 23; Par. Nos. [0011], [0014], [0045], [0046], [0054] & WO 01/7066 A2 & AU 2000/68259 B & EP 1200114 A2	1,3,4,7,9, 11-17
Y	PETERS, JM. et al., 'Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome prolifera tor-activated receptor $\beta(5)$ .' Mol.Cell.Biol., (2000), Vol.20, No.14, pages 5119 to 5128, full text	1,3,4,7,9, 11-17
Y	SALUJA, I. et al., 'PPAR $\delta$ agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture.' Glia, (2001), Vol.33, No.3, pages 191 to 204, full text	1,3,4,7,9, 11-17
Y	BASU-MODAK, S. et al., 'Peroxisome proliferator- activated receptor $\beta$ regulates acyl-CoA synthe tase 2 in reaggregated rat brain cell cultures.', J.Biol.Chem., (1999), Vol.274, No.50, pages 35881 to 35888, full text	1,3,4,7,9, 11-17



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005429

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 10-324626 A (Ono Pharmaceutical Co., Ltd.), 08 December, 1998 (08.12.98), Full text; Claims 8, 9; Par. Nos. [0021], [0035] & EP 632008 A1 & CA 2124784 A1 & JP 7-316092 A & JP 9-118644 A & JP 10-204023 A & US 6201021 A & US 2003/96802 A	1,3,4,7, 11-16
X	JP 2002-543124 A (Merck Patent GmbH.), 17 December, 2002 (17.12.02), Full text & WO 00/66110 A1 & AU 2000/47481 B & EP 1185259 A1 & US 6395780 A	1,3,4,7, 11-16
X	WO 01/39779 A1 (UCB S.A.), 07 June, 2001 (07.06.01), Full text & AU 2001/15241 B & EP 1244456 A1 & JP 2003-515564 A	1,3,4,7, 11-16
X	JP 2002-539245 A (SYNCHRONEURON, LLC.), 19 November, 2002 (19.11.02), Full text & WO 00/56301 A2 & AU 2000/38950 B & EP 1162960 A2 & US 6391922 A & US 2002/119912 A	1,3,4,7, 11-16
X	Megumi TAKAHASHI et al., 'Shorei Hokoku Valproic Acid Natrium ga Boryoku ni Yuko de atta Alzheimer-gata Chiho no 1 Rei', Brain and nerve, (1996), Vol.48, No.8, pages 757 to 760, full text	1,3,4,7, 11-16
A	LAMPEN, A. et al., 'New molecular bio-assays for the estimation of the teratogenic potency of valproic acid derivatives in vitro: activa tion of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR $\delta$ ).', Toxicol.Appl.Pharmacol., (1999), Vol.160, No.3, pages 238 to 249	1,3,4,7, 11-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005429

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.: 2, 5, 6, 8, 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 2,5,6,8 and 10 involve embodiments for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005429

<Subject of search>

Claim 1 relates to a remedy containing, as the active ingredient, a compound defined by a desired property "a PPAR $\delta$  agonist". Although claim 1 involves any compounds having this property, it is recognized that only small part of the claimed compounds are supported by the description in the meaning within PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning within PCT Article 5.

Even though the common technical knowledge at the point of the application is considered, the scope of "PPAR $\delta$  agonist" cannot be specified. Thus, claim 1 does not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search was made mainly on the relationship among the compounds specified in claims 9 and 17 and other compounds having been clarified as having a PPAR $\delta$  agonist activity and effects of ameliorating any of the diseases as described in claim 1.